

**КОЖИНА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА**

**ОСОБЕННОСТИ РАЗОБЩАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЖИРНЫХ  
КИСЛОТ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПРИ СТАРЕНИИ  
ЖИВОТНЫХ И ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ IN VITRO**

03.00.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань  
2007

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной биологии биолого-химического факультета ГОУ ВПО «Марийский государственный университет» (г. Йошкар-Ола)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Самарцев Виктор Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией регуляции клеточного окисления Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань Гордон Лев Хаймович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, г. Санкт-Петербург Савина Маргарита Васильевна

Ведущая организация: НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Защита состоится «27» сентября 2007 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 200\_\_ года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук  Абрамова З.И.

жизненно важных органов при старении / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, М.П. Каратецкова, Л.С. Полищук // Бюллетень сибирской медицины. Приложение 1. Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда.- Новосибирск, 2005.- С.119.

12. Кожина О.В. Особенности разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени животных различного возраста / О.В. Кожина, Л.С. Полищук, В.Н. Самарцев // Тезисы докладов и лекций XIII международного совещания и VI школы по эволюционной физиологии. Санкт-Петербург, 23 – 28 января 2006г.- Санкт-Петербург, 2006.- С.108–109.

13. Кожина О.В. Индуцированное окислительным стрессом образование комплекса ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени в процессе разобщающего действия жирных кислот / О.В. Кожина, В.Н. Самарцев // Биология - наука XXI века. 10-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН, 17 – 21 апреля 2006г.- Пущино, 2006.- С.79.

14. Samartsev V.N. Oxidative stress induce formation in liver mitochondria of the complex of ADP/ATP and aspartate/glutamate antiporters at fatty acid uncoupling activity / V.N. Samartsev, O.V. Kozhina, L.S. Polishchuk // Biochim. Biophys. Acta; EBEC Short Reports.- 2006.- V.14.- P.389.

15. Самарцев В.Н. Окислительный стресс в митохондриях печени усиливает протоноформное разобщающее действие жирных кислот в присутствии физиологических субстратов ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 5 – 7 июня 2007г.- Пущино, 2007.- С.194–197.

жирных кислот в митохондриях печени при условии формирования разобщающего комплекса / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Биологические мембраны.- 2006.- Т.23, №5.- С.402–411.

5. Самарцев В.Н. Сравнительное исследование протонофорного и кальций-зависимого разобщающего действия пальмитата в митохондриях печени морских свинок *Cavia porcellus* зрелого и старческого возрастов / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Журнал эволюционной биохимии и физиологии.- 2006.- Т.42, №4.- С.397–398.

6. Самарцев В.Н. Соотношение между дыханием и синтезом АТФ в митохондриях печени при ингибировании транспорта электронов малонатом и в условиях токсического стресса / В.Н. Самарцев, И.П. Зелди, О.В. Кожина, Л.Б. Киселёва, О.В. Полозова, Л.С. Полищук // Биологические мембраны.- 2007.- Т.24, №3.- С.235–243.

7. Полищук Л.С. Возрастная зависимость образования тепла в митохондриях печени / Л.С. Полищук, О.В. Кожина, В.Н. Самарцев // Альманах «Новые исследования». Материалы международной научной конференции «Физиология развития человека», Москва, 22-26 ноября 2004г.- №1-2.- Москва, 2004.- С. 312.

8. Kozhina O.V. Formation of redox-dependent complex at participation of ADP/ATP- and aspartate/glutamate antiporters during the uncoupling of oxidative phosphorylation by fatty acid in liver mitochondria of old rats / O.V. Kozhina, V.N. Samartsev // Материалы юбилейной конференции, посвященной 70-летию основоположника российской биоэнергетики академика В.П. Скулачева, «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке», МГУ 21 – 23 февраля 2005г.- Москва, 2005.- С. 46 – 47.

9. Кожина О.В. Особенности участия ADP/ATP и аспартат/глутаматного антипортеров в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени старых животных / О.В. Кожина, В.Н. Самарцев // Биология - наука XXI века. 9-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых 18 – 22 апреля 2005г.- Пущино, 2005.- С. 82.

10. Самарцев В.Н. Изменение окислительно-восстановительного состояния пиридиновых нуклеотидов и SH-групп мембранных белков как фактор регуляции разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 6 – 9 июня 2005г.- Пущино, 2005.- С.274–277.

11. Самарцев В.Н. Образование комплекса мембранных белков в митохондриях как один из пусковых механизмов нарушения функций

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Митохондрии являются не только высокоэффективными энергетическими станциями, обеспечивающими клетку АТФ и теплом, но и участвуют в ее гибели по типу апоптоза и некроза. Эта альтернативная функция митохондрий связана с усилением продукции активных форм кислорода (Lenaz, 1998; Hugnes et al., 2005; Skulachev, 2006). В настоящее время известны различные пути образования активных форм кислорода в митохондриях. В дыхательной цепи в процессе одноэлектронного восстановления кислорода в I и III комплексах образуется непосредственно супероксидный анион-радикал, из которого вследствие последующих химических реакций, как ферментативных, так и неферментативных, могут образовываться пероксид водорода, гидроксильный радикал и другие активные формы кислорода (Lenaz, 1998; Brand et al., 2004; Андреев и др., 2005). Показано, что при старении животных в митохондриях усиливается продукция активных форм кислорода (Lenaz, 1998; Barja, 2002a; Brand et al., 2004; Judge et al., 2005). Это, в свою очередь, приводит к мутации митохондриальной ДНК, окислительному повреждению белков и перекисному окислению липидов и, согласно одной из теорий старения, является ведущей причиной дегенеративных изменений в органах и тканях, усиливающихся с возрастом (Lenaz, 1998; Barja, 2002b; Hagen et al., 2002; Brand et al., 2004; Judge et al., 2005). Предполагается, что наблюдаемые при старении окислительные повреждения митохондрий связаны со снижением активности одного из природных антиоксидантов  $\alpha$ -токоферола (Armeni et al., 2003; Kamzalov et al., 2004).

При моделировании окислительного стресса в митохондриях широко применяются гидроперекиси органических соединений, например, *трет*-бутилгидропероксид (Lötscher et al., 1979; Costantini et al., 1996; Slyshenkov et al., 2002). В отсутствие ионов кальция обработка митохондрий этим оксидантом приводит к окислению пиридиновых нуклеотидов и глутатиона (Lötscher et al., 1979; Siess et al., 1988; Slyshenkov et al., 2002; Liu et al., 1996), к образованию метильного и других свободных радикалов (Kennedy et al., 1992), к повышению уровня гидропероксидов (Martin et al., 2000) и диеновых конъюгатов (Nigam et al., 1999; Slyshenkov et al., 2002).

Одним из путей подавления продукции активных форм кислорода в митохондриях является снижение разности электрохимических потенциалов протонов ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) на внутренней мембране при усилении протонной проводимости (Korshunov et al., 1998; Skulachev, 1998; 2006). Показано, что это может быть достигнуто

с помощью природных разобшителей окислительного фосфорилирования свободных (неэтерифицированных) жирных кислот (Korshunov et al., 1998). В настоящее время известны различные пути разобшающего действия жирных кислот (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова, 2005). В отсутствие ионов кальция протонофорное разобшающее действие жирных кислот в митохондриях печени осуществляется при участии белков-переносчиков внутренней мембраны: ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров (Samartsev et al., 1997b; Skulachev, 1998; Самарцев и др., 1999; Мохова и Хайлова, 2005). В этом случае ингибитор ADP/ATP-антипортера карбоксиатрактилат и субстраты аспартат/глутаматного антипортера аспартат и глутамат способны подавлять разобшающее действие жирных кислот (Samartsev et al., 1997a; Skulachev, 1998; Самарцев и др., 1999; Мохова и Хайлова, 2005). Участие ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в разобшающем действии жирных кислот заключается в переносе аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный, в то время как последующий перенос недиссоциированной формы кислоты через бислой осуществляется без участия белков по механизму флип-флоп (Skulachev, 1998; Мохова и Хайлова, 2005). Было предположено, что модификация ADP/ATP- антипортера продуктами перекисного окисления липидов может привести к усилению протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий в присутствии жирных кислот (Мохова и Хайлова, 2005). Интересно предположить, что при окислительном стрессе наряду с ADP/ATP-антипортером изменяются свойства и аспартат/глутаматного антипортера, и это сопровождается повышением скорости переноса аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный и (или) устранением способности лигандов этих переносчиков подавлять этот транспорт. Представляет интерес исследовать влияние антиоксидантов с различным механизмом действия на разобшающее действие жирных кислот в митохондриях старых животных в условиях эндогенного окислительного стресса, а также в митохондриях молодых животных при индукции окислительного стресса *in vitro*.

**Целью настоящей работы** является выяснение роли окислительного стресса как регулятора протонофорного разобшающего действия жирных кислот в митохондриях печени при старении животных и действии *in vitro* окисляющих агентов.

#### **Задачи исследования:**

1. В опытах *in vitro* оценить интенсивность генерации диеновых конъюгатов и эффективность действия антиоксидантов в митохондриях печени молодых и старых крыс.

## **ВЫВОДЫ**

1. Инкубация митохондрий печени в отсутствие синтеза АТР и разобшителей окислительного фосфорилирования приводит к аккумуляции диеновых конъюгатов. Этот процесс протекает более интенсивно в митохондриях печени старых крыс, чем молодых, и ингибируется антиоксидантами и протонофорным разобшителем FCCP.

2. В отсутствие антиоксидантов или FCCP протонофорное разобшающее действие пальмитата в митохондриях печени старых крыс, в отличие от митохондрий молодых, не подавляется карбоксиатрактилатом и аспартатом по отдельности.

3. В митохондриях печени молодых крыс при окислительном стрессе *in vitro*, вызванном *трет*-бутилгидропероксидом, так же, как в митохондриях старых животных, протонофорное разобшающее действие пальмитата не подавляется карбоксиатрактилатом и аспартатом по отдельности.

4. В присутствии физиологических субстратов ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров ADP и аспартата протонофорная разобшающая активность пальмитата в митохондриях молодых и старых крыс усиливается при окислительном стрессе.

5. Способность антиоксидантов при разобшении пальмитатом включать респираторное действие карбоксиатрактилата, ADP и аспартата блокируется одним из реагентов на SH-группы *n*-этилмалеимидом.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Самарцев В.Н. Особенности разобшающего действия жирных кислот в митохондриях печени крыс различного возраста / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Биологические мембраны.- 2005.- Т.22, № 2.- С.92–97.
2. Самарцев В.Н. Соотношение между дыханием и синтезом АТР в митохондриях при различной степени разобшения окислительного фосфорилирования / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Биофизика.- 2005.- Т.50, № 4.- С.660–667.
3. Кожина О.В. Респираторное действие ADP при разобшении пальмитатом окислительного фосфорилирования в митохондриях печени / О.В. Кожина, М.П. Каратецкова, В.Н. Самарцев // Биологические мембраны.- 2006.- Т.23, №3.- С.213–218.
4. Самарцев В.Н. Количественная характеристика участия ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в разобшающем действии

В отличие от карбоксиатрактилата другой лиганд ADP/АТФ-антипортера ADP в митохондриях печени старых крыс не подавляет разобщающее действие пальмитата как в отсутствии, так и в присутствии аспартата. Однако в присутствии антиоксидантов, когда продукция активных форм кислорода в митохондриях снижается, ADP приобретает способность подавлять разобщающее действие пальмитата. Аналогичным действием обладают восстановители тиоловых групп даже в том случае, когда антиоксиданты не эффективны. При этих условиях совместное действие физиологических субстратов ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров ADP и аспартата подавляет разобщающее действие пальмитата приблизительно в той же степени, как совместное действие карбоксиатрактилата и аспартата. Эти данные позволяют говорить о том, что ADP способен ингибировать транспорт аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный только в том случае, если тиоловые группы, принадлежащие, возможно, ADP/АТФ-антипортеру, находятся в восстановленном состоянии. Модификация этого переносчика, заключающаяся в окислении или алкилировании *n*-этилmaleимидом его SH-групп, приводит к устранению ингибирующего действия ADP. Можно предположить, что генерация активных форм кислорода в митохондриях старых крыс, приводящая к окислению SH-групп ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров, может быть также причиной увеличения скорости транспорта аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный и в отсутствие ADP. Совместное действие этих двух факторов, по-видимому, является причиной значительного повышения разобщающей активности пальмитата в присутствии ADP и аспартата.

Таким образом, развитие окислительного стресса в митохондриях печени как старых, так и молодых животных в присутствии физиологических субстратов ADP/АТФ- и аспартат-глутаматного антипортеров ADP и аспартата приводит к повышению протонофорной разобщающей активности пальмитата. Такое усиление мягкого разобщающего действия жирных кислот, вызванное окислительной модификацией ADP/АТФ- и аспартат-глутаматного антипортеров, можно рассматривать как один из механизмов антиоксидантной защиты митохондрий. Вполне возможно, что этот механизм включается при избыточной продукции активных форм кислорода в митохондриях старых животных, а также при действии окисляющих агентов в митохондриях молодых, компенсируя тем самым недостаток природных антиоксидантов.

2. Выяснить, имеются ли различия в протонофорном разобщающем действии пальмитата при участии ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени молодых и старых крыс.

3. Исследовать влияние окислительного стресса *in vitro*, вызванного *трет*-бутилгидропероксидом, на протонофорное разобщающее действие пальмитата в митохондриях печени молодых крыс.

4. Изучить влияние физиологических субстратов ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров ADP и аспартата на протонофорное разобщающее действие пальмитата в митохондриях печени молодых и старых крыс в отсутствии и присутствии антиоксидантов и окисляющего агента *трет*-бутилгидропероксида.

5. Выяснить, какова роль тиоловых групп митохондрий печени в модуляции протонофорной разобщающей активности жирных кислот при развитии окислительного стресса в митохондриях как молодых, так и старых крыс.

**Научная новизна работы.** Впервые установлено, что инкубация митохондрий печени старых крыс приводит к развитию окислительного стресса и это вызывает устранение способности лигандов ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров, соответственно карбоксиатрактилата и аспартата, подавлять протонофорное разобщающее действие жирных кислот. Такие, свойственные для митохондрий старых крыс, особенности протонофорного разобщающего действия жирных кислот могут быть воспроизведены на митохондриях молодых животных путем инкубации органелл с окисляющим агентом *трет*-бутилгидропероксидом. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что как в митохондриях старых, так и молодых животных, окислительный стресс индуцирует модификацию ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров, связанную с окислением критических SH-групп митохондрий. В присутствии физиологических субстратов этих переносчиков, соответственно ADP и аспартата, такая модификация приводит к усилению протонофорной разобщающей активности пальмитата.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В митохондриях печени старых животных окислительный стресс, обусловленный пониженной активностью пассивной утечки протонов в условиях недостаточного защитного действия природных антиоксидантов, приводит к модификации ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров, проявляющейся в устранении способности лигандов этих переносчиков подавлять протонофорное разобщающее действие жирных кислот.

2. В митохондриях печени молодых животных аналогичная модификация ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров может быть воспроизведена путем инкубации органелл с окисляющим агентом *трет*-бутилгидропероксидом.

3. В присутствии физиологических субстратов ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров - ADP и аспартата - вызванная окислительным стрессом модификация этих переносчиков в митохондриях печени как молодых, так и старых животных, приводит к повышению протонофорной разобщающей активности пальмитата.

4. Модификация ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров в митохондриях печени молодых и старых животных связана с окислением критических SH-групп митохондрий.

**Научно-практическое значение работы.** Полученные результаты расширяют и углубляют представления о механизмах функционирования митохондрий в норме и при окислительном стрессе, развивающемся при старении животных и действии окисляющих агентов *in vitro*. Результаты диссертации могут быть использованы в фундаментальных исследованиях в области биоэнергетики, а также в клеточной патофизиологии и медицине, поскольку в настоящее время известно, что окислительный стресс является одним из ведущих пусковых механизмов, приводящих к гибели клеток по типу апоптоза и некроза.

**Апробация работы.** Материалы диссертации представлены на международной научной конференции «Физиология развития человека» (Москва, 2004); на юбилейной конференции, посвященной 70-летию академика В.П. Скулачева «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке» (Москва, 2005); на 9-ой и 10-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2005 и 2006); на международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2005; 2007); на V Сибирском физиологическом съезде (Новосибирск, 2005); на XIII международном совещании по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006); на «XIV European Bioenergetic Conference» (Moscow, 2006).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами и 28 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов исследования; полученных экспериментальных данных, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 193 библиографических названия, в том числе 167 зарубежных.

пальмитата на 80%, т.е. в равной степени в митохондриях старых и молодых крыс. Снижение продукции активных форм кислорода в митохондриях с помощью применяемых антиоксидантов или FCCP приводит к тому, что карбоксиатрактилата и аспартат приобретают способность подавлять разобщающее действие пальмитата.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в митохондриях печени старых животных окислительный стресс, обусловленный пониженной активностью пассивной утечки протонов в условиях недостаточного защитного действия антиоксидантов, приводит к модификации ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров.

Показано, что аналогичного характера изменения респондирующих эффектов карбоксиатрактилата и аспартата при разобщении пальмитатом наблюдаются также в митохондриях печени молодых крыс в том случае, если они были обработаны окисляющим агентом *трет*-бутилгидропероксидом. И в этом случае антиоксиданты тролокс и тиомочевина восстанавливают респондирующие эффекты карбоксиатрактилата и аспартата. Следовательно, описанные выше особенности респондирующих эффектов карбоксиатрактилата и аспартата при разобщении пальмитатом в митохондриях старых крыс обусловлены интенсивным формированием активных форм кислорода. Эти особенности могут быть воспроизведены на митохондриях молодых крыс в условиях окислительного стресса, вызванного *трет*-бутилгидропероксидом и при алкилировании SH-групп митохондрий *n*-этилмалеимидом.

Таким образом, модификация ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров происходит как при окислении, так и при алкилировании критических SH-групп митохондрий. Полученные результаты можно объяснить, основываясь на известной гипотезе о том, что ADP/ATP- и аспартат/глутаматный антипортеры могут функционировать совместно как разобщающий комплекс с общим пулом жирных кислот (Самарцев и др., 2002а). По-видимому, формирование разобщающего комплекса происходит как при окислении, так и при алкилировании одних и тех же критических SH-групп митохондрий. По-видимому, при этих условиях жирные кислоты приобретают способность перемещаться от одного переносчика к другому: под влиянием карбоксиатрактилата от ADP/ATP-антипортера к аспартат/глутаматному антипортеру, под влиянием аспартата – в противоположном направлении. Благодаря такому перемещению в присутствии карбоксиатрактилата компенсируется выключение из разобщения ADP/ATP-антипортера, а в присутствии аспартата – аспартат/глутаматного антипортера.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования показали, что в митохондриях старых крыс содержание диеновых конъюгатов выше, чем в митохондриях молодых. Поскольку формирование диеновых конъюгатов как первичных продуктов перекисного окисления липидов связано с дислокацией двойной связи в полиненасыщенных жирных кислотах при действии свободных радикалов, и в том числе супероксидного анион-радикала (Romaschin et al., 1990; Ambrosio et al., 1991; Sokol et al., 1991; Dröge, 2002), полученные результаты можно рассматривать как подтверждение известных данных об усилении в митохондриях при старении животных продукции активных форм кислорода (Lenaz, 1998; Barja, 2002a; Brand et al., 2004; Judge et al., 2005).

Установлено, что инкубация митохондрий в контролируемом состоянии сопровождается аккумуляцией диеновых конъюгатов и этот процесс протекает более интенсивно в митохондриях старых животных, чем в митохондриях молодых. Это различие может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, более интенсивной продукцией активных форм кислорода в митохондриях старых животных по сравнению с митохондриями молодых. Как известно, продукция активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий очень сильно зависит от  $\Delta\Psi$  (Korshunov et al., 1998; Skulachev, 1998; 2006). В этом случае даже очень небольшое снижение  $\Delta\Psi$ , вызванное небольшим увеличением протонной проводимости внутренней мембраны с помощью каких-либо протонотропных разобщителей (мягкое разобщение), приводит к значительному ингибированию продукции активных форм кислорода (Korshunov et al., 1998; Skulachev, 1998; 2006). Как показано в настоящей работе, очень небольшое увеличение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий старых животных с помощью протонотропного разобщителя FCCP приводит к подавлению аккумуляции диеновых конъюгатов. Второй причиной более интенсивной аккумуляции диеновых конъюгатов в митохондриях старых животных по сравнению с митохондриями молодых является снижение при старении активности природных антиоксидантов, в частности,  $\alpha$ -токоферола (Armeni et al., 2003; Kamzalov et al., 2004). Вследствие этого нарушается утилизация активных форм кислорода, образующихся в митохондриях в контролируемом состоянии.

Установлено, что карбоксиатрактилат и аспартат, будучи добавленные к митохондриям печени старых крыс в присутствии пальмитата по отдельности, не обладают респираторным действием. Однако совместно эти агенты подавляют разобщающее действие

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение митохондрий из печени крыс. В опытах использованы белые беспородные крысы-самцы в возрасте 6 – 9 месяцев с массой тела 200 – 250 г (молодые крысы) и 22 – 26 месяцев с массой тела 420 – 500 г (старые крысы). Содержание, кормление и забор животных соответствовали необходимым требованиям, изложенным в соответствующем руководстве (Западнюк и др., 1983). Митохондрии из печени животных выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования (Pedersen et al., 1978). Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭГТА, 5 мМ MOPS-трис (pH 7,4). Для удаления эндогенных жирных кислот митохондрии преинкубировали с очищенным от жирных кислот БСА. Суспензию митохондрий (60-70 мг митохондриального белка в 1 мл среды выделения) хранили на льду. Белок определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА.

Регистрация дыхания суспензии митохондрий. Дыхание митохондрий регистрировали при температуре 25°C с помощью кислородного электрода Кларка и полярографа LP-9. Концентрация белка митохондрий в кислородной ячейке ~1,2 – 1,3 мг/мл. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ сукцинат калия, 2 мМ  $MgCl_2$ , 0,5 мМ ЭГТА, 10 мМ MOPS-трис (pH 7,0 или 7,4). Олигомицин (2 мкг/мл) и 2 мкМ ротенон добавляли в кислородную ячейку сразу после митохондрий. При определении скорости дыхания в процессе окислительного синтеза АТФ (состояние 3) среда инкубации дополнительно содержала 5 мМ  $KH_2PO_4$  без олигомицина. В этом случае через 2 мин. после ротенона к митохондриям добавляли 200 мкМ ADP. Величину коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом (Hinkle and Yu, 1979).

Респираторные эффекты карбоксиатрактилата и аспартата выражали в процентах и определяли как отношение величины ингибирования дыхания в присутствии пальмитата одним из этих респираторных агентов к величине стимуляции дыхания пальмитатом по формуле  $100 \times \Delta J_u / (J_u - J_o)$ , где  $J_u$  и  $J_o$  - скорости дыхания соответственно в присутствии и в отсутствие пальмитата,  $\Delta J_u$  - величина снижения скорости дыхания респираторным агентом.

Разобщающая активность пальмитата. Протонотропную разобщающую активность пальмитата, согласно разработанному ранее подходу (Самарцев и др., 2004) определяли как увеличение скорости дыхания пальмитатом, отнесенное к его концентрации по формуле:  $(J_u - J_o)/[U]$ , где  $J_u$  и  $J_o$  - скорости дыхания митохондрий без учета их концентрации

(мкМ  $O_2$ /мин) соответственно до и после добавки пальмитата, [U] – концентрация пальмитата (мкМ).

**Определение диеновых конъюгатов.** Содержание диеновых конъюгатов в митохондриях определяли после экстракции в гептане спектрофотометрическим методом (Ambrosio et al., 1991). Увеличение содержания диеновых конъюгатов в митохондриях в процессе их инкубации в контролируемом состоянии определяли следующим образом. Митохондрии (1,4 мг белка на мл) суспендировали в среде инкубации при перемешивании при 25°C. Одновременно с митохондриями в среду вносили олигомицин (2 мкг/мл) и 2 мкМ ротенона. Другие соединения, исходя их задачи исследований, добавляли одновременно с этими ингибиторами. Отбор проб (по 0,7 мл) в первый раз осуществляли сразу после этих добавок и во второй – через 5 мин. Увеличение содержания диеновых конъюгатов в митохондриях выражали как разницу между величинами оптической плотности гептанового экстракта при 233 нм в начальный момент времени инкубации митохондрий ( $\Delta A_0$ ) и через 5 мин ( $\Delta A$ ) или в относительных единицах как фактор  $\alpha$ , который определяли по формуле:  $\alpha = (\Delta A - \Delta A_0) / \Delta A_0$ .

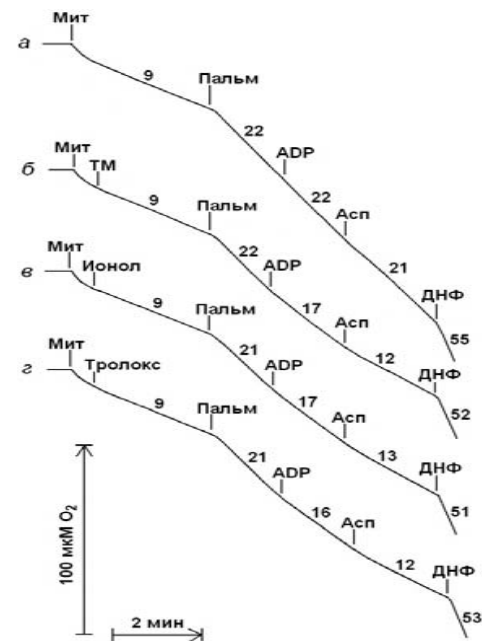
В работе использовали MOPS, трис, пальмитиновую кислоту, FCCP, олигомицин, сукцинат калия, глутамат калия, аспартат калия, карбоксиатрактиллат, тиомочевину, *n*-этилмалеимид, пируват натрия, очищенный от жирных кислот БСА ("Sigma", США), ионол, тролокс ("Aldrich", США), ротенон, ЭГТА ("Serva", Германия), ДНФ, трет-бутилгидропероксид, сахарозу ("Fluka" Германия), KCl,  $MgCl_2$  ("Merck", Германия). Остальные реактивы квалификации х.ч. и ос.ч. произведены в России. Использовали растворы пальмитиновой кислоты (20 мМ) в этаноле.

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента с помощью пакета прикладных программ Statistica-6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Особенности разобщающего действия пальмитата и ресопрягающих эффектов карбоксиатрактиллата и аспартата в митохондриях старых крыс

Одним из индикаторов усиления генерации активных форм кислорода в клетках при различных патологических состояниях является аккумуляция продуктов перекисного окисления липидов, в том числе диеновых конъюгатов (Romaschin et al., 1990; Sokol et al., 1991; Ambrosio et al., 1991; Dröge, 2002). Как показано на рисунке 1, в



**Рисунок 7.** Влияние антиоксидантов: 0,3 мМ тиомочевины (ТМ), 20 мкМ тролокса и 10 мкМ ионола на дыхание митохондрий печени старых крыс в присутствии 30 мкМ пальмитата (Пальм) и при последующем добавлении 200 мкМ ADP, 3 мМ аспартата (Асп) и 50 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ).

Как предположено выше, способность ADP и аспартата подавлять разобщающее действие жирных кислот зависит от окислительно-восстановительного состояния тиоловых групп, возможно принадлежащих ADP/АТФ- и аспартат/глутаматному антипортерам. Можно ожидать, что реагенты, алкилирующие тиоловые группы, например *n*-этилмалеимид, будут оказывать влияние на ресопрягающие эффекты ADP и аспартата. Установлено, что *n*-этилмалеимид, будучи добавленный одновременно с митохондриями, препятствует проявлению ресопрягающих эффектов ADP и аспартата в присутствии антиоксидантов тролокса и тиомочевины. Полученные данные свидетельствуют о том, что при алкилировании тиоловых групп ADP и аспартат не проявляют ресопрягающего действия даже в присутствии антиоксидантов.



Полученные результаты свидетельствуют о том, что в митохондриях печени протонофорная разобщающая активность пальмитата в присутствии физиологических субстратов ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров зависит от интенсивности формирования активных форм кислорода. В присутствии антиоксидантов разобщающая активность пальмитата приблизительно на 80% подавляется ADP и аспаратом. Без антиоксидантов формирование активных форм кислорода в контролируемом состоянии сопровождается аккумуляцией диеновых конъюгатов и приводит к изменению свойств ADP/ATP- антипортера. Эта модификация вызывает устранение ресопрягающего действия ADP, но не карбоксиатрактилата.

В условиях интенсивной продукции активных форм кислорода (при обработке митохондрий *трет*-бутилгидропероксидом) наряду с ADP/ATP-антипортером модифицируется и аспартат/глутаматный антипортер, и это приводит к устранению ресопрягающих эффектов одновременно ADP и аспартата.

Исследовано ресопрягающее действие ADP и аспартата при разобщении пальмитатом в митохондриях печени старых крыс. Установлено, что ADP и аспартат в отсутствии антиоксидантов не влияют на дыхание митохондрий печени старых крыс в присутствии пальмитата (таблица 6).

**Таблица 6.** Влияние антиоксидантов на ресопрягающие эффекты ADP, аспартата (Асп) и их совместного действия (ADP + Асп) при разобщении пальмитатом окислительного фосфорилирования в митохондриях печени старых крыс. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего

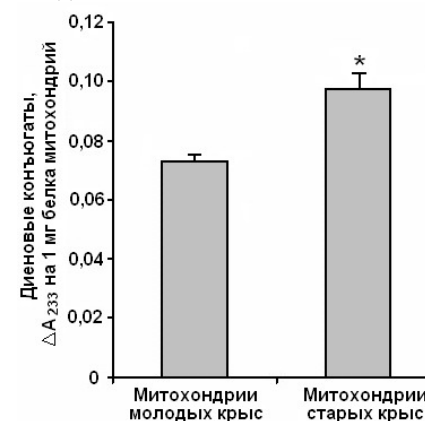
Ресопрягающие соединения	Ресопрягающий эффект, %			
	Контроль (n = 4)	Тиомочевина (n = 4)	Ионол (n = 4)	Тролокс (n = 4)
ADP	0 $\pm$ 0	38,0 $\pm$ 2,9*	36,1 $\pm$ 1,9*	38,2 $\pm$ 2,1*
Асп	7,3 $\pm$ 2,1	37,2 $\pm$ 2,3*	35,6 $\pm$ 1,6*	36,3 $\pm$ 1,8*
ADP + Асп	7,3 $\pm$ 2,1	75,2 $\pm$ 3,7*	71,7 $\pm$ 2,3*	74,5 $\pm$ 2,2*

\* Различия между опытом (присутствие антиоксиданта) и контролем (отсутствие антиоксиданта) статистически достоверны,  $p < 0,01$  (критерий Стьюдента).

В то же время в присутствии тиомочевины, ионола или тролокса ADP и аспартат заметно подавляют разобщающее действие пальмитата (таблица 6; рис. 7).

В присутствии этих физиологических субстратов ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров разобщающая активность пальмитата под влиянием антиоксидантов многократно снижается.

митохондриях старых крыс уровень диеновых конъюгатов выше, чем в митохондриях молодых.



**Рисунок 1.** Содержание диеновых конъюгатов в митохондриях печени молодых и старых крыс. Приведены средние значения + стандартная ошибка среднего (n=8-9).

\* Различия между показателями митохондрий молодых и старых крыс статистически достоверны,  $p < 0,01$  (критерий Стьюдента).

Инкубация митохондрий печени в контролируемом состоянии в течение 5 мин в присутствии сукцината, ротенона и олигомицина приводит к аккумуляции диеновых конъюгатов, и этот процесс более интенсивно протекает в митохондриях старых крыс. Полученные результаты подтверждают известные данные о том, что при старении животных в митохондриях усиливается генерация активных форм кислорода, что, в свою очередь, приводит к аккумуляции продуктов перекисного окисления липидов (Lenaz, 1998; Barja, 2002a; 2002b; Hagen et al., 2002; Judge et al., 2005).

В опытах использовали хорошо известные антиоксиданты – уборщики свободных радикалов, отличающиеся по химической структуре и по степени растворимости в воде и липидах: растворимое только в воде тиоловое соединение тиомочевину (Зенков и др., 2001), аналог  $\alpha$ -токоферола тролокс, растворимый как в воде, так и в липидах (Davies et al., 1988), и высокоэффективный липидорастворимый фенольный антиоксидант ионол (другое название бутилгидрокситолуол) (Биленко, 1989).

Все эти антиоксиданты замедляют аккумуляцию диеновых конъюгатов в митохондриях печени старых крыс в процессе их инкубации в контролируемом состоянии (таблица 1). Подавление

аккумуляции диеновых конъюгатов наблюдается также при инкубации митохондрий в присутствии протонофорного разобщителя FCCP (таблица 1), что согласуется с известными данными о подавлении образования активных форм кислорода в митохондриях путем индукции мягкого разобщения (Korshunov et al., 1997; 1998; Skulachev, 1998).

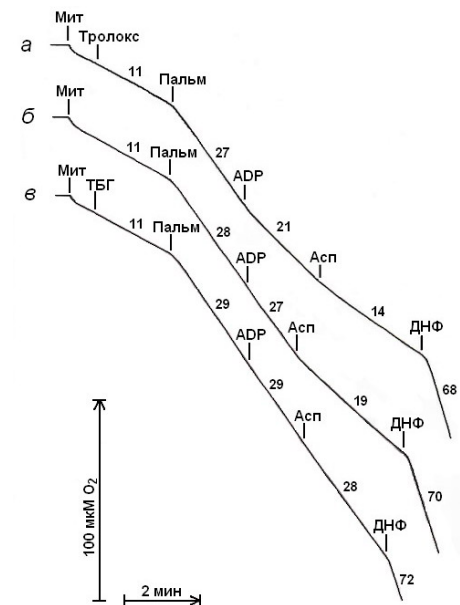
**Таблица 1.** Влияние антиоксидантов на аккумуляцию диеновых конъюгатов в митохондриях печени старых крыс в контролируемом состоянии. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части, рН 7,4. Исследуемые соединения были добавлены сразу после митохондрий. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего

Условия эксперимента	$\alpha$ (относительные единицы)
Контроль (n = 8)	$0,235 \pm 0,022$
Тиомочевина 0,2 мМ (n = 5)	$0,060 \pm 0,022^*$
Тролокс 20 мкМ (n = 5)	$0,074 \pm 0,024^*$
Ионол 10 мкМ (n = 4)	$0,081 \pm 0,023^*$
FCCP 20 нМ (n = 4)	$0,077 \pm 0,021^*$

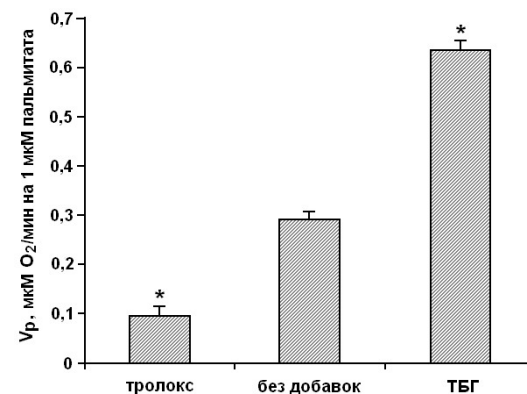
\* Различия между опытом (присутствие антиоксиданта) и контролем (отсутствие антиоксиданта) статистически достоверны,  $p < 0,01$  (критерий Стьюдента).

Не выявлено различий в скорости дыхания в состоянии 3 и в коэффициенте ADP/O в митохондриях печени молодых и старых крыс. Вместе с тем в митохондриях старых животных скорость дыхания в состоянии 4 меньше, а коэффициент дыхательного контроля больше, чем в митохондриях молодых. Это хорошо согласуется с известными из литературных источников данными, что усиление образования активных форм кислорода в митохондриях печени при старении животных может не сопровождаться снижением скорости дыхания в состоянии 3 и показателей сопряженности дыхания и окислительного фосфорилирования (Paradies et al., 1991; Kerner et al., 2001; Bakala et al., 2003).

При изучении разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени в среде инкубации обязательно присутствовали ЭГТА, ионы магния, олигомицин и ротенон. В присутствии этих реагентов, как известно (Самарцев и др., 1999), стимуляция дыхания митохондрий жирными кислотами обусловлена только их протонофорным действием, главным образом, при участии ADP/АТФ-антипортера и аспартат/глутаматного антипортера. В наших экспериментах применялся пальмитат как анион одной из наиболее распространенных природных жирных кислот (Wojtczak et al., 1993). Установлено, что зависимость скорости дыхания митохондрий печени



**Рисунок 5.** Стимуляция дыхания митохондрий печени пальмитатом и влияние на дыхание АДФ и аспартата в присутствии тролокса (а), в отсутствии добавок (б), в присутствии *трет*-бутилгидропероксида (в). Добавки: 200 мкМ АДФ, остальные добавки как на рис. 2.



**Рисунок 6.** Разобщающая активность пальмитата ( $V_p$ ) в присутствии 25 мкМ тролокса, в отсутствии добавок и в присутствии 0,1 мМ ТБГ.

\* Различия между опытом (присутствие тролокса и ТБГ) и контролем (в отсутствие добавок) статистически достоверны,  $p < 0,01$  (критерий Стьюдента).

аспартат/глутаматный антипортеры могут функционировать совместно как разобщающий комплекс с общим пулом жирных кислот (Самарцев и др., 2002а).

Полученные результаты позволяют говорить о том, что эффект *трет*-бутилгидропероксида связан с усилением свободно-радикальных процессов, вызывающих окисление критических SH-групп митохондрий. Аналогичные характерные изменения респондирующих эффектов карбоксиатрактилата и аспартата наблюдаются также при инкубации митохондрий с *n*-этилмалеимидом, способным непосредственно взаимодействовать с SH-группами митохондрий.

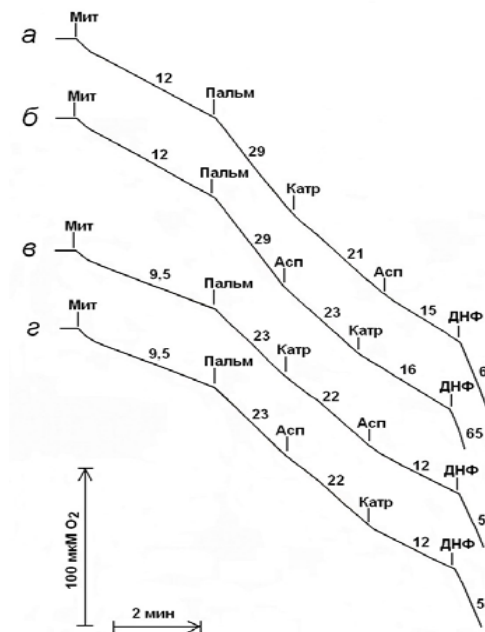
### 3. Респондирующее действие ADP при разобщении пальмитатом окислительного фосфорилирования в митохондриях печени молодых и старых крыс

В следующих экспериментах карбоксиатрактилат был заменен 0,2 мМ ADP. ADP эффективно подавляет стимулированное пальмитатом дыхание митохондрий в присутствии тролокса, в то время как в отсутствие этого антиоксиданта не влияет на дыхание (рис. 5). Аспартат обладает респондирующим действием как в присутствии, так и в отсутствие этого антиоксиданта (рис. 5). При инкубации митохондрий с *трет*-бутилгидропероксидом ADP и аспартат не оказывают влияния на разобщающую активность пальмитата (рис. 5).

Как показано на рисунке 6, в присутствии ADP и аспартата протонофорная разобщающая активность пальмитата минимальна при обработке митохондрий тролоксом и достигает максимальных значений при обработке митохондрий *трет*-бутилгидропероксидом. Аналогичные результаты получены при замене тролокса тиомочевинной или пируватом.

крыс от концентрации пальмитата в пределах от 0 до 40 мкМ близка к линейной.

Дыхание митохондрий молодых крыс в присутствии пальмитата эффективно подавляется карбоксиатрактилатом и аспартатом независимо от порядка их добавок (рис. 2, кривые а и б). В отличие от этого дыхание митохондрий старых крыс в присутствии пальмитата практически не подавляется карбоксиатрактилатом в то время как последующее добавление аспартата приводит к почти полному подавлению его разобщающего действия (рис. 2, кривая в). При добавлении указанных реагентов в другой последовательности – после пальмитата аспартат, а затем карбоксиатрактилат – наблюдается обратный эффект (рис. 2, кривая г).



**Рисунок 2.** Дыхание митохондрий печени молодых (а и б) и старых (в и г) крыс в присутствии 30 мкМ пальмитата (Пальм) и при последующем добавлении 1 мкМ карбоксиатрактилата (Катр), 3 мМ аспартата (Асп) и 50 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ).

Тиомочевина, ионол и тролокс в равной степени увеличивают респондирующие эффекты карбоксиатрактилата, аспартата, но не

влияют на величину респираторного эффекта при совместном действии карбоксиатрактилата и аспартата (таблица 2).

**Таблица 2.** Влияние антиоксидантов на дыхание митохондрий печени старых крыс при разобщающем действии пальмитата и при последующем добавлении карбоксиатрактилата и аспартата в различной последовательности. Исследуемые соединения: 0,2 мМ тиомочевина, 10 мкМ ионола или 20 мкМ тролокса были добавлены сразу после митохондрий. Другие добавки: 30 мкМ пальмитата (Пальм), 1 мкМ карбоксиатрактилата (Катр), 3 мМ аспартата (Асп) и 50 мкМ ДНФ. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего

Добавки	Скорость дыхания (нмоль O <sub>2</sub> /мин на 1 мг белка)			
	Контроль (n = 8)	Тиомочевина (n = 5)	Ионол (n = 6)	Тролокс (n = 4)
Без добавок	9,5 $\pm$ 0,3	9,6 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,3	9,6 $\pm$ 0,4
Пальм	23,2 $\pm$ 0,6	23,8 $\pm$ 1,1	24,0 $\pm$ 0,9	23,5 $\pm$ 0,8
Пальм + Катр	21,8 $\pm$ 0,4	17,6 $\pm$ 0,8*	18,0 $\pm$ 0,5*	17,5 $\pm$ 0,6*
Пальм + Катр + Асп	12,2 $\pm$ 0,3	12,5 $\pm$ 0,6	12,7 $\pm$ 0,3	12,1 $\pm$ 0,4
Пальм+Катр+Асп+ДНФ	52,6 $\pm$ 1,3	58,0 $\pm$ 6,5	51,0 $\pm$ 2,4	50,6 $\pm$ 3,2
Без добавок	9,7 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 0,5	9,9 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,4
Пальм	23,0 $\pm$ 0,7	22,8 $\pm$ 1,2	23,1 $\pm$ 0,6	22,8 $\pm$ 0,9
Пальм + Асп	22,0 $\pm$ 0,5	18,1 $\pm$ 1,1*	18,1 $\pm$ 0,5*	18,0 $\pm$ 0,5*
Пальм + Асп + Катр	12,2 $\pm$ 0,4	12,4 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,5
Пальм+Асп+Катр+ДНФ	52,2 $\pm$ 1,7	53,4 $\pm$ 4,9	53,8 $\pm$ 2,9	51,5 $\pm$ 3,1

\* Различия между опытом (присутствие антиоксиданта) и контролем (отсутствие антиоксиданта) статистически достоверны,  $p < 0,01$  (критерий Стьюдента).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что подавление продукции активных форм кислорода в митохондриях печени старых крыс в контролируемом состоянии с помощью антиоксидантов придает карбоксиатрактилату и аспартату способность подавлять разобщающее действие пальмитата.

## 2. Влияние вызванного *трет*-бутилгидропероксидом окислительного стресса и *n*-этилмалеимида на разобщающее действие пальмитата и респираторные эффекты карбоксиатрактилата и аспартата

При моделировании окислительного стресса в митохондриях использовали известный окисляющий агент *трет*-бутилгидропероксид. Можно предположить, что модификация *трет*-бутилгидропероксидом разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров может быть вызвана продуктами перекисного окисления липидов или окислением критических SH-групп. Необходимы дальнейшие исследования

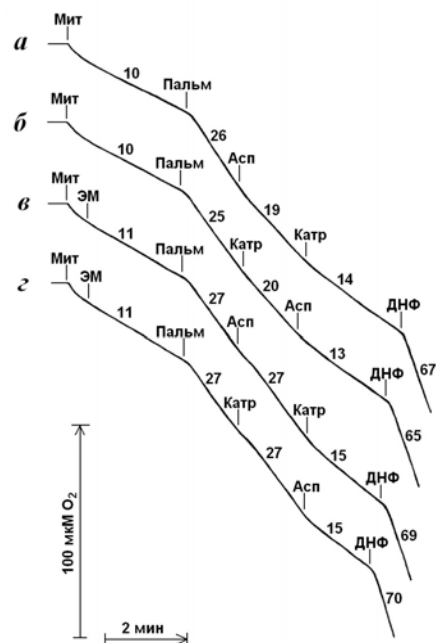
соединений после пальмитата, но при добавлении их в другой последовательности – карбоксиатрактилата после аспартата или аспартата после карбоксиатрактилата – эти агенты в существенной степени ингибируют дыхание (рис. 4 и таблица 5). Этот эффект *n*-этилмалеимида не проявляется при добавлении его к митохондриям одновременно с тиомочевинной или меркаптоэтанолом (таблица 5). Как известно, тиоловые соединения способны в растворе связываться с *n*-этилмалеимидом (Fopuo, 1979), образуя таким образом не способный взаимодействовать с SH-группами комплекс. В отличие от тиомочевины и меркаптоэтанола пируват и тролокс не влияют на эффекты *n*-этилмалеимида (таблица 5). Следовательно, алкилирование критических SH-групп митохондрий *n*-этилмалеимидом моделирует действие окислительного стресса, вызванного *трет*-бутилгидропероксидом.

**Таблица 5.** Влияние *n*-этилмалеимида (ЭМ) в отсутствии и присутствии пирувата, тиомочевины, меркаптоэтанола и тролокса на респираторные эффекты аспартата (Асп) и карбоксиатрактилата (Катр) при разобщающем действии пальмитата в митохондриях печени. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части, pH 7,0. Асп – аспартат, 3 мМ; Катр – карбоксиатрактилат, 1 мкМ. Добавки других указанных в таблице соединений – вместе с *n*-этилмалеимидом. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего

Условия опыта	Респираторный эффект, %		
	Асп	Катр	Асп + Катр
Контроль (n = 6)	46,3 $\pm$ 1,8	33,5 $\pm$ 2,1	80,0 $\pm$ 1,9
ЭМ 25 мкМ (n = 5)	0	0	73,0 $\pm$ 2,1
ЭМ 25 мкМ + пируват 7 мМ (n = 4)	0	0	72,3 $\pm$ 2,3
ЭМ 25 мкМ + тиомочевина 0,3 мМ (n = 4)	46,9 $\pm$ 2,8	34,1 $\pm$ 1,0	81,6 $\pm$ 3,8
ЭМ 25 мкМ + меркаптоэтанол 0,5 мМ (n = 4)	41,6 $\pm$ 3,5	32,3 $\pm$ 2,9	78,8 $\pm$ 2,1
ЭМ 25 мкМ + тролокс 30 мкМ (n = 4)	0	0	71,9 $\pm$ 1,9

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что вызванный *трет*-бутилгидропероксидом окислительный стресс так же, как влияние *n*-этилмалеимида, в митохондриях печени при разобщающем действии пальмитата приводит к изменению характера респираторных эффектов карбоксиатрактилата и аспартата. Каждый из этих респираторных агентов не оказывает влияние на действие пальмитата, в то время как совместно они на 80% подавляют его разобщающее действие. Эти данные можно объяснить, основываясь на известной гипотезе о том, что ADP/ATP- и

митохондриях в процессе их инкубации в контролируемом состоянии с *трет*-бутилгидропероксидом приводит к устранению респондирующих эффектов карбоксиатрактилата и аспартата. Такая модификация ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров, участвующих в разобщающем действии пальмитата, может быть вызвана продуктами перекисного окисления липидов и (или) окислением критических SH-групп. Очевидно, что в этом случае антиоксиданты – уборщики свободных радикалов эффективны только при добавлении их в начальный момент времени инкубации митохондрий.



**Рисунок 4.** Стимуляция дыхания митохондрий пальмитатом и влияние на дыхание аспартата и карбоксиатрактилата в отсутствии и присутствии *n*-этилмалеимида. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части, pH 7,0. ЭМ – *n*-этилмалеимид, 25 мкМ; Пальм – пальмитат, 30 мкМ; Асп – аспартат, 3 мМ; Катр – карбоксиатрактилат, 1 мкМ; ДНФ – 2,4-динитрофенол, 50 мкМ.

В следующих экспериментах митохондрии были инкубированы в контролируемом состоянии *n*-этилмалеимидом. Этот SH-реагент не влияет на дыхание митохондрий в отсутствие и в присутствии пальмитата. В то же время *n*-этилмалеимид устраняет респондирующие эффекты аспартата и карбоксиатрактилата при введении этих

механизмов регуляции протонофорного разобщающего действия жирных кислот при окислительном стрессе.

Инкубация митохондрий молодых крыс в контролируемом состоянии в присутствии сукцината, ротенона и олигомицина сопровождается аккумуляцией диеновых конъюгатов (таблица 3), что свидетельствует об усилении свободно-радикальных реакций, инициирующих перекисное окисление липидов (Slater, 1984; Ambrosio et al., 1991). Уборщики свободных радикалов тролокс и тиомочевина замедляют аккумуляцию диеновых конъюгатов в контролируемом состоянии (таблица 3). Подавление аккумуляции диеновых конъюгатов наблюдается также при инкубации митохондрий в присутствии пальмитата (таблица 3), что согласуется с известными данными о способности жирных кислот подавлять образование активных форм кислорода в митохондриях путем индукции мягкого разобщения (Korshunov et al., 1998; Skulachev, 1998). Аккумуляция диеновых конъюгатов не наблюдается в присутствии пирувата (таблица 3). Как известно, пируват в присутствии ротенона способен повышать степень восстановленности митохондриальных пиридиновых нуклеотидов, это, в свою очередь, вызывает повышение восстановленности глутатиона и других тиоловых групп (Lehninger et al., 1978; Rigobello et al., 1995), которые, являясь антиоксидантами, ингибируют продукцию диеновых конъюгатов (Slater, 1984; Davies et al., 1988).

**Таблица 3.** Влияние *трет*-бутилгидропероксида (ТБГ), антиоксидантов и других модулирующих агентов на аккумуляцию диеновых конъюгатов в митохондриях печени в контролируемом состоянии. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части, pH 7,0. Исследуемые соединения были добавлены сразу после митохондрий. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего

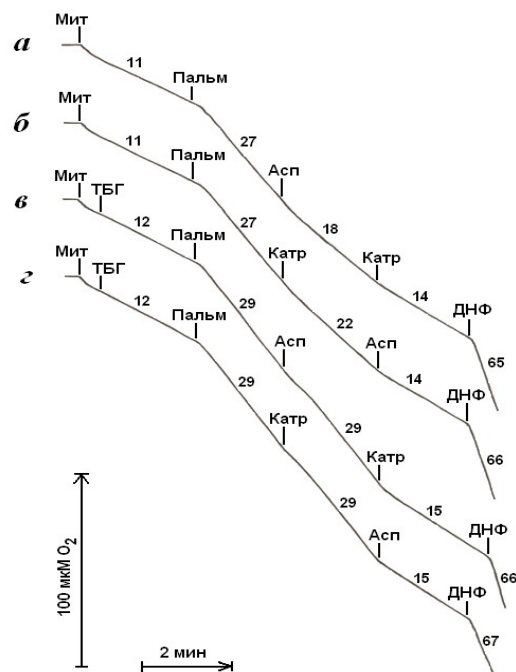
Условия эксперимента	$\alpha$ (относительные единицы)
Контроль (n = 9)	0,203 $\pm$ 0,018
Пируват 7 мМ (n = 5)	0,027 $\pm$ 0,012*
Тиомочевина 200 мкМ (n = 5)	0,060 $\pm$ 0,022*
Тролокс 30 мкМ (n = 5)	0,065 $\pm$ 0,010*
Пальмитат 25 мкМ (n = 6)	0,079 $\pm$ 0,020*
ТБГ 0,1 мМ (n = 6)	0,327 $\pm$ 0,026*
<i>n</i> -Этилмалеимид 25 мкМ (n = 6)	0,081 $\pm$ 0,021*
ТБГ 0,1 мМ + тролокс 30 мкМ (n = 4)	0,164 $\pm$ 0,018
ТБГ 0,1 мМ + пируват 7 мМ (n = 4)	0,092 $\pm$ 0,023*

\* Различия между опытом (присутствие модулирующего агента) и контролем (отсутствие модулирующего агента) статистически достоверны,  $p < 0,01$  (критерий Стьюдента).

Аккумуляция диеновых конъюгатов подавляется и *n*-этилмалеимидом (таблица 3). По-видимому, это связано со

способностью *n*-этилмалеимида ингибировать образование свободных радикалов в митохондриях (Kennedy et al., 1986; Chen et al., 1999). Обработка митохондрий *трет*-бутилгидропероксидом в низкой концентрации усиливает аккумуляцию диеновых конъюгатов в контролируемом состоянии. Этот эффект *трет*-бутилгидропероксида ослабляется тролоксом и пируватом (таблица 3).

В отсутствие *трет*-бутилгидропероксида дыхание митохондрий печени в присутствии пальмитата подавляется при последующем добавлении аспартата, а затем карбоксиатрактилата (рис. 3, кривая *а*), или сначала карбоксиатрактилата, а затем аспартата (рис. 3, кривая *б*).



**Рисунок 3.** Стимуляция дыхания митохондрий пальмитатом и влияние на дыхание аспартата и карбоксиатрактилата в отсутствии и присутствии *трет*-бутилгидропероксида. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части, рН 7,0. ТБГ – *трет*-бутилгидропероксид, 0,1 мМ; Пальм – пальмитат, 30 мкМ; Асп – аспартат, 3 мМ; Катр – карбоксиатрактилат, 1 мкМ; ДНФ – 2,4-динитрофенол, 50 мкМ.

При обработке митохондрий *трет*-бутилгидропероксидом дыхание в присутствии пальмитата не подавляется аспартатом или карбоксиатрактилатом при введении этих соединений после

пальмитата, но при добавлении их в другой последовательности – карбоксиатрактилата после аспартата или аспартата после карбоксиатрактилата – эти агенты в существенной степени ингибируют дыхание (рис. 3, кривые *в* и *г*). Вместе с тем *трет*-бутилгидропероксид не влияет на дыхание митохондрий в присутствии одного пальмитата или пальмитата в присутствии одновременно аспартата и карбоксиатрактилата (рис. 3).

Инкубация митохондрий с *трет*-бутилгидропероксидом в контролируемом состоянии в соответствии с условиями, указанными на рисунке 3, приводит к изменению характера респираторных эффектов карбоксиатрактилата и аспартата. Каждый из этих респираторных агентов не оказывает влияния на действие пальмитата, в то время как совместно они на 80% подавляют его разобщающее действие (таблица 4).

**Таблица 4.** Влияние *трет*-бутилгидропероксида (ТБГ) в отсутствии и присутствии пирувата, тролокса и тиомочевины на респираторные эффекты аспартата (Асп) и карбоксиатрактилата (Катр) при разобщающем действии пальмитата в митохондриях печени при рН 7,0 (1) и 7,4 (2). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части. Асп – аспартат, 3 мМ; Катр – карбоксиатрактилат, 1 мкМ. Добавка *трет*-бутилгидропероксида, как на рисунке 3. Добавка других указанных в таблице соединений – вместе с *трет*-бутилгидропероксидом. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего

	Условия опыта	Респираторный эффект, %		
		Асп	Катр	Асп + Катр
1	Контроль (n = 6)	49,5 ± 1,8	31,3 ± 2,5	80,3 ± 1,9
	ТБГ 0,1 мМ (n = 5)	0	0	75,3 ± 2,3
	ТБГ 0,1 мМ + пируват 7 мМ (n = 5)	47,4 ± 1,9	30,7 ± 1,7	79,0 ± 2,5
	ТБГ 0,1 мМ + тролокс 30 мкМ (n = 4)	44,1 ± 1,9	35,0 ± 1,8	79,1 ± 1,8
2	Без добавок (n = 6)	34,0 ± 1,4	45,4 ± 1,4	79,6 ± 1,7
	ТБГ 0,2 мМ (n = 4)	0	0	73,7 ± 2,7
	ТБГ 0,2 мМ + пируват 7 мМ (n = 4)	32,4 ± 1,9	45,6 ± 1,3	78,6 ± 1,9
	ТБГ 0,2 мМ + тиомочевина 0,3мМ (n=4)	34,2 ± 1,3	45,8 ± 1,7	80,9 ± 1,4

В следующих экспериментах митохондрии были инкубированы в контролируемом состоянии в присутствии *трет*-бутилгидропероксида и одного из агентов, вызывающих подавление аккумуляции диеновых конъюгатов: пирувата, тролокса или тиомочевины. Установлено, что при этих условиях *трет*-бутилгидропероксид не оказывает влияния на респираторные эффекты карбоксиатрактилата и аспартата (таблица 4).

Полученные результаты позволяют говорить о том, что увеличение интенсивности свободно-радикальных реакций в